

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-238679

(43)Date of publication of application : 04.09.2001

(51)Int.Cl. C12N 15/09

C07K 14/47

C12Q 1/34

C12Q 1/68

C12Q 1/70

(21)Application number : 2000-056093 (71)Applicant : INST OF PHYSICAL &
CHEMICAL RES
HAZAMA YOKO

(22)Date of filing : 01.03.2000 (72)Inventor : HAZAMA YOKO

(54) METHOD FOR JUDGING RESISTANCE TO ONSET OF BOVINE LEUKEMIA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for simply judging the resistance of a bovine individual to the onset of leukemia for bovine leukemia virus(BLV) with a high accuracy by a genetic engineering technique.

SOLUTION: This method for judging the resistance of a bovine to the onset of leukemia for bovine leukemia virus BLV comprises judging that a bovine individual in which an amino acid specified by an amino acid No.74 of a β 1 domain of a bovine MHC Class II DR β chain is Glu, an amino acid specified by an amino acid No.77 is Arg and an amino acid specified by an amino acid No.78 is Val has the resistance to the onset of leukemia. Furthermore, the method comprises judging that the bovine individual has high resistance to the onset of leukemia when an amino acid specified by an amino acid No.71 is Lys or Arg.

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application other
than the examiner's decision of rejection
or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] bovine leukemia virus BLV the amino acid which it is the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow, the amino acid specified by the amino acid number 74 of beta1 domain of the cow MHC ClassII DR beta chain of a cow individual is Glu, and the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- approach of judging a cow individual to be those with onset resistance to leukemia.

[Claim 2] The method according to claim 1 of judging the cow individual as the onset resistance over leukemia being high, when the amino acid furthermore specified by the amino acid number 71 is Lys or Arg.

[Claim 3] Bovine leukemia virus BLV It is the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow. following process: -- genomic DNA separated from (1) cow individual Polymerase chain reaction (PCR) DNA which amplifies and carries out the code of some or all of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain Included PCR Process: and the (2) above PCR which prepare a product DNA contained in a product In the amino acid sequence by which a code is carried out The amino acid specified by the amino acid number 74 of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain is Glu. the amino acid which the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- approach containing process; which judges a cow individual to be those of leukemia with onset resistance.

[Claim 4] The method according to claim 3 of judging the cow individual as the onset resistance over leukemia being high, when the amino acid furthermore specified by the amino acid number 71 is Lys or Arg.

[Claim 5] It is the approach of sorting out a cow individual with the high onset resistance over leukemia. The following process : (1) They are DRB40 or DRB100, and Reverse as a Forward primer. As a primer genomic DNA separated from the cow individual using SRB3 Polymerase chain reaction (PCR) It amplifies. Cow MHC Some or all of beta1 domain of a ClassII DR beta chain DNA which carries out a

code Included PCR Approach the cow individual includes the process judged as the onset resistance over leukemia being high when process: which prepares a product, and a (2) above-mentioned PCR product are not digested by PstI and DraIII.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention is a bovine leukemia virus BLV. It is related with the approach of evaluating the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow.

[0002]

[Description of the Prior Art] Major histocompatibility antigen (MHC) It is the molecule which participates in discernment of a self--nonself in a living body's infection defense mechanism, and it consists of a class II which consists of Class I, alpha chain, and beta chain which consist of an alpha chain and beta2M, and the slot which bites an antigen peptide exists in each alpha1 and alpha2 domain and alpha1 and beta1 domain. And it has the description that only the fragmentation peptide held in this slot is recognized by the T-cell receptor, cell death (cellular immunity) was attained by the CD8+ cell which has recognized Class I, and Class II has been recognized. CD4+ An antibody production (humoral immunity) is mainly guided by the cell.

[0003] MHC It is the gene cluster which was most rich in polymorphism, and the location of the pocket of a peptide hold slot, a form, magnitude, and description change with the haplotypes, the integrated state of the fragmentation peptide bit in connection with it changes, and it is thought that the immune response and disease susceptibility for every individual are determined. MHC About correlation with haplotype, disease resistance (disease resistance), or onset possibility (*****), there is a report of Homo sapiens immune disorder UIUSU (HIV), an adult T cell leukemia virus (HTLV), and malaria, for example. On the other hand, it is Cow MHC (BoLA). It is about a class II gene until now. DQA, DQB, DRA, DRB, DNA, DOB, and DYA, And DYB Existence of a gene is guessed. Three genes (DRB1 -B3) identified in the DRB locus especially About DRB3, carrying out the code of the functional protein is known inside, and existence of 73 kinds of alleles is clarified by current. However, the infectivity disease of a cow and Cow MHC (BoLA) About correlation

with haplotype, there is almost no report conventionally.

[0004] Especially, it is Homo sapiens immune disorder UIUSU. (HIV) Bovine leukemia virus which it has the gene PX which adjusts virus multiplication similarly, and is a retrovirus of a close relationship most at HTLV-I (BLV) If it attaches, it is Cow MHC (BoLA). Although the American group has reported correlation with haplotype and durability lymphocytosis focusing on disease resistance, there is no report of relevance with leukemia onset possibility. The cow infected with this virus is 10 – 20% comparatively (rate of infection in Japan), and since 1 of them – 2 % show the symptoms of very malignant endemic cow leukemia and die after the long-term latent period of about ten – 15 years, the economic loss to the dairy farmer which this virus causes is very serious. It is BLV by the analysis of cow MHC (BoLA) haplotype. If the onset possibility of the cow after infection can be judged easily, it is expected that it becomes possible to choose the cow of onset resistance beforehand and to breed it, and it becomes possible to continue breeding of a cow safely extremely.

[0005] On the other hand, this invention persons are Cows MHC (BoLA) previously. DRB among class II genes The structure of a locus is analyzed and it is DRB3 gene (BoLA-DRB3). And structure of the gene product was clarified.

(Biochem.Biophys.Res.Comm., 209, pp.981–988, 1995) . this invention person is BoLA-DRB3 at the time of studying the function of this gene further, a leukemia onset cow, and the cow non-developed [symptoms]. It found out that the part from which an amino acid sequence differs clearly especially in inside in the gene product from the second exon (beta1 domain) with which polymorphism is accepted existed. Moreover, this amino acid substitution is BLV. It found out participating in the receiving onset possibility and onset resistance directly. a radical [knowledge / such] -- carrying out -- this invention persons -- bovine leukemia virus BLV the amino acid which is the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow, and is specified by the amino acid number 78 of beta1 domain of the cow MHC ClassII DR beta chain of a cow individual -- Val it is -- the approach of judging a cow individual to be those of leukemia with onset resistance was completed (international public presentation 98/No. 3680).

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention and Means for Solution] The technical problem of this invention is a bovine leukemia virus (BLV). Cow MHC (BoLA) Correlation with haplotype is solved and it is the bovine leukemia virus (BLV) of a cow individual. It is in offering the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia simple and with high precision by the gene engineering-technique. It is the technical problem of this invention to offer the judgment approach which enables a judgment more specifically still highly precise than the judgment approach indicated by the above-mentioned international public presentation 98/No. 3680. Moreover, another technical problem of this invention is to provide the above-mentioned judgment approach with a useful primer set.

[0007] When this invention persons inquired wholeheartedly that the above-mentioned technical problem should be solved, they came to complete a header and this invention for Arg specified by the amino acid number 77 of beta1 domain of a cow MHCClassII DR beta chain having a meaning important for the onset resistance of cow leukemia.

[0008] That is, this invention is a bovine leukemia virus BLV. The approach of judging the cow individual whose amino acid specified by the amino acid number 74 of beta1 domain of the cow MHC ClassII DR beta chain of a cow individual are the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow, and is Glu (glutamic acid), whose amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg (arginine) and whose amino acid specified by the amino acid number 78 is Val (valine) to be those with onset resistance to leukemia is offered.

[0009] Moreover, it is a bovine leukemia virus BLV by this invention. It is the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow. The amino acid specified by the amino acid number 71 of beta1 domain of the cow MHC ClassII DR beta chain of a cow individual is Lys (lysine) or Arg. The approach of judging the cow individual whose amino acid specified by the amino acid number 74 is Glu, whose amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg and whose amino acid specified by the amino acid number 78 is Val as the onset resistance over leukemia being high is offered. According to the desirable mode of these invention, it is a bovine leukemia virus BLV. The above-mentioned approach of performing to the infected cow is offered.

[0010] According to another mode of this invention, it is a bovine leukemia virus BLV. It is the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow. following process: -- genomic DNA separated from (1) cow individual Polymerase chain reaction (PCR) DNA which amplifies and carries out the code of some or all of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain Included PCR Process: and the (2) above PCR which prepare a product DNA contained in a product In the amino acid sequence by which a code is carried out The amino acid specified by the amino acid number 74 of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain is Glu. the amino acid which the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- the approach containing process; which judges a cow individual to be those of leukemia with onset resistance is offered.

[0011] Moreover, bovine leukemia virus BLV It is the approach of judging the resistance of the receiving onset of leukemia of a cow. following process: -- genomic DNA separated from (1) cow individual Polymerase chain reaction (PCR) DNA which amplifies and carries out the code of some or all of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain Included PCR Process: and the (2) above PCR which prepare a product DNA contained in a product In the amino acid sequence by which a code is carried out The amino acid specified by the amino acid number 71 of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain is Lys or Arg. The amino acid

specified by the amino acid number 74 is Glu, and the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg. and the amino acid specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- the approach containing process; which judges a cow individual as the onset resistance over leukemia being high is offered by this invention.

[0012] Furthermore by this invention, the approach of sorting out a cow individual with the high onset resistance over leukemia simple is offered. This approach following process: (1) as a Forward primer -- DRB40 and Reverse Genomic DNA separated from the cow individual, using SRB3 as a primer Polymerase chain reaction (PCR) It amplifies. Cow MHC Some or all of beta1 domain of a ClassII DR beta chain DNA which carries out a code Included PCR When process: which prepares a product, and a (2) above-mentioned PCR product are not digested by PstI and DraIII, an approach including the process which the cow individual judges as the onset resistance over leukemia being high is offered. The amino acid with which the amino acid with which the amino acid with which the amino acid with which the cow individual sorted out by this approach is specified by the amino acid number 71 in beta1 domain of a MHC ClassII DR beta chain is Lys or Arg, and is specified by the amino acid number 74 is Glu, and is specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 is Val.

[0013]

[Embodiment of the Invention] The approach of this invention is a bovine leukemia virus BLV. The infected cow or bovine leukemia virus BLV It is the approach of judging the resistance of the onset of leukemia of the individual about a non-infected cow. A cow individual is a bovine leukemia virus BLV. It is the anti-bovine leukemia virus BLV whether it is infected or not. Checking easily by the trial using an antibody is possible.

[0014] In the desirable mode of this invention, it is genomic DNA from a cow individual. PCR after dissociating It is Cow MHC ClassII by law. beta1 domain of DR beta chain (the second exon of DRB3 gene) PCR which amplified specifically the gene which carries out the code of a part or all, and was obtained The amino acid sequence which performs sequencing of a product and is specified by the amino acid numbers 71-78 of beta1 domain is presumed. the amino acid which the amino acid specified by the amino acid number 74 is Glu in this amino acid sequence, and the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- a cow individual is judged to be those with onset resistance to leukemia. moreover, the amino acid which the amino acid specified by the amino acid number 71 is Lys or Arg, the amino acid specified by the amino acid number 74 is Glu, and the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- it is judged with the cow individual having high onset resistance to leukemia.

[0015] In order to perform the above-mentioned judgment to accuracy more although the cow individual has resistance to leukemia when the above-mentioned amino acid sequence of beta1 domain contains the above-mentioned specific amino

acid residue at least in one side of allele, it is desirable to compare the above-mentioned amino acid sequence in allele (haplotype). the amino acid which the amino acid specified by the amino acid number 74 is Glu in the above-mentioned amino acid sequence (amino acid number 71-78) of both alleles, and the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- a cow individual has high onset resistance to leukemia. moreover, the amino acid which the amino acid specified by the amino acid number 71 is Lys or Arg in the above-mentioned amino acid sequence (amino acid number 71-78) of both alleles, the amino acid specified by the amino acid number 74 is Glu, and the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- the cow individual has high resistance especially to leukemia.

[0016] about the amino acid sequence of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain, there is a report by between (Aida, Y., et al., Biochem.Biophys.Res.Comm., 209, pp.981-988, 1995). In Fig. 1 of the international public presentation 98/No. 3680, it is mRNA of a cow MHC ClassII DR beta chain. Structure (A) It reaches. cDNA Amino acid sequence of an overall length and a gene product (B) Although shown, beta1 domain is a part specified according to the amino acid sequence from the amino acid number 1 to the amino acid number 94 among drawing.

[0017] If especially the cow set as the object of the judgment approach of this invention may not be limited, but may be infected with a bovine leukemia virus BLV and the symptoms of leukemia may be shown by infection, it is good for what kind of cows, such as a dairy breed, a **** dual purpose breed, *****, *****, and a **** dual purpose breed. Although the form of Japanese beef [, such as Japanese Black Cattle and Japanese silicule], Holstein, JAJI, Hereford, Aberdeen Angus, and free pretty ** can be mentioned, specifically, it is not limited to these forms.

[0018] From a cow individual to genomic DNA Peripheral blood, an organ, etc. can be used as a sample for preparing. As an organ, explants, such as lymph gland, can be used, for example. From the above-mentioned sample to genomic DNA As an approach of preparing, as long as it is available to this contractor, what kind of thing may be used. When using a peripheral blood leucocyte or a peripheral blood lymphocyte as a sample, it is Hughes's and others approach. (Hughes, S.H.et al., Cell, 15, pp.1397-1410, 1978) It can use. Sodium dodecyl sulfate, the phenol-chloroform method in using an organ, after carrying out thin sectioning of the frozen explant with scissors, for example (413 pp.403- Mcknight, G.S., Cell, 14, 1978) It can prepare. Moreover, genomic DNA from a cell A simple extraction method may be used. The example is shown in the example of the international public presentation 98/No. 3680.

[0019] Prepared genomic DNA PCR As a primer which is used in amplifying by law, it is Cow MHC ClassII. DNA containing the gene which carries out the code of the partial amino acid sequence to the amino acid numbers 75-78 of beta1 domain of

DR beta chain, or the overall length of beta1 domain As long as it can amplify, what kind of thing may be used.

[0020] the approach of this invention -- especially -- suitable -- as the set of an usable primer -- cycle sequencing and DINA bead DNA The following primer set (1) in which the direct seeking sensing methods, such as direct sequence, are possible : A primer: -- 5 -- '-TGTAACGACGGCCAGTCTCTCTCTGCAGCACATTTCT-3' --; and B primer: -- 5 -- '-CAGGAAACAGCTATGACCCGCGCTGCACAGTGAACTC-3' can be mentioned.

[0021] moreover, as a primer set which added the restriction enzyme site primer set (2) A primer: -- 5 -- '-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTTCT-3' --; and B primer: -- 5 -- '-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3' -- Or a primer set (3) A primer : 5'-GAGTGTCATTTCTTCAACGGGAC-3', Primer chosen from the group which consists of 5 '-GGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGA-3' and 5'-GGAATTCCTCTCTCTGCAGCACATTTCT-3'; B primer: 5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3' can be used.

[0022] Especially, it is a primer set (3). PCR used and amplified After digesting an allyl compound by PstI, it can judge simple whether the cow individual is leukemia resistance by judging the difference in a cutting pattern.

[0023] Furthermore, primer set (4):A primer DRB40:5'-GAGTGTCATTTCTTCAACGGGAC-3', B primer SRB3: 5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAACTC-3' or primer set (5):A primer DRB100:5'-GGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGA-3' B primer SRB3:5' - AAGTCGACCGCTGCACAGTG PCR amplified using AACTC-3' When PstI and DraIII are made to act on an allyl compound and a magnification product is not digested The amino acid with which the cow individual is specified by the amino acid number 71 of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain is Lys or Arg. the amino acid which the amino acid specified by the amino acid number 74 is Glu, and the amino acid specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- ** -- it can judge and having high resistance to leukemia can judge simple. But the primer available to an approach and primer set of this invention are not limited to these.

[0024] PCR DNA used for law Although the amount is selectable suitably, when a peripheral blood leucocyte or a peripheral blood lymphocyte is used, for example 0.1-0.5 mug It is extent. Moreover, although what kind of thing may be used as a sequence determining method of DNA (PCR product) amplified as mentioned above as long as it is available to this contractor, it is desirable to use the direct sequence method etc. for example. The example is indicated by the example of the international public presentation 98/No. 3680 at the detail.

[0025] In addition, it may be unable to be determined which alleles many cows are by the direct sequence method, if it is heterozygote (heterozygote) and the base sequences of the allele of a father or the mother origin differ. In such a case, the

above-mentioned primer set (2) PCR used and amplified It becomes possible by carrying out subcloning of the product to a vector after digestion with restriction enzymes EcoRI and Sal I, and determining and comparing the base sequence of only one of the two's allele to determine the base sequence of another allele certainly. It is PCR in order to acquire gene information more correctly. It is desirable to carry out subcloning of both alleles from a product, and to determine each base sequence. The concrete approach and available primer are also indicated by the example of the international public presentation 98/No. 3680 at the detail.

[0026] Although an example explains this invention still more concretely below an example, the range of this invention is not limited to the following example. In addition, the detail of typing of beta1 domain of the use meaning of a primer and the cow MHC ClassII DR beta chain which are used in the following examples is indicated by the Japanese-Patent-Application-No. No. 373483 [11 to] specification.

[0027] (A) an ingredient and approach (1) PCT-SBT -- law 120 every of μ M -- x1 rTaq buffer solution of 50microl containing the recombination Ta1 DNA expanding enzyme (rTaq) (TOYOBO) of each primer of $MgCl_2$ of dNTP and 1.5 mM, and 0.2microM, and two units Genomic DNA prepared from the cow individual with the simple extraction method to [10 mM Tris-HCl, 50mM KCl, and 0.1% TritonX-100] 20-40 mug was dissolved. It is at 95 degrees C about denaturation processing. It carries out for 5 minutes and then is 30 seconds at 40 seconds; 60 degrees C in 95 degrees C.; And it was made to elongate for 2 minutes at 72 more degrees C after 20 cycles processing by making processing for 40 seconds into 1 cycle by 72 degrees C. As a primer, it is cow MHC Class II DR beta chain:BoLA-DRbeta. The primer which can amplify specifically the second exon of DRB3 gene which carries out the code of the beta1 domain by the PCR method was used.

ERB3N : 5'-GGA ATT CCT CTC TCT GCA GCA CAT TTC C-3'HL031 : 5'-TTT AAA TTC GCG CTC ACC TCG CCG CT-3' [0028] One among the products

acquired by above-mentioned PCR PCR using the Forward primer which can amplify eight kinds of allele group specific primers, and all alleles for mul It was made to amplify by law (PCR-SSP). 120 Every of μ M -- $MgCl_2$ of dNTP and 1.5 MM, and Allele Group Specific Forward Primer of 0.2MicroM -- The Reverse primer of 200microM, and AmpliTaq GoldTM DNA of one unit Expanding enzyme (PE Biosystems), 1 25 including the above-mentioned PCR product of mul It is at 95 degrees C about denaturation processing to x1 GeneAmpR Gold Buffer of mul. It carries out for 10 minutes. Next, it is for 1 minute at 95 degrees C.; It is 30 seconds at 64 degree C.; And 20 cycles are processed by making processing for 30 seconds into 1 cycle at 72 degrees C, It is for 5 minutes at 72 more degrees C. It was made to elongate. [0029] a) Allele group specific Forward primer : BoLA-DRB3 According to the array of amino acid which carries out a code, the second exon divided allele into eight groups, and designed the following primers which can amplify each specifically.

sp1: 5'- TGT AAA ACG ACG-GCC-AGT-AGC-ACA TTT CCT GCA GTA TC
 -3'sp2: 5'- TGT AAA ACG ACG GCC-AGT-AGC-ACA-TTT
 CCT-GGA-GTA-TTC-TAA -3'sp3: 5'- TGT AAA ACG-ACG-GCC-AGT-AGC
 ACA-TTT-CCT-GGA-GTA TTA -3'sp4: 5'- TGT AAA-ACG-ACG-GCC-AGT
 AGC-ACA-TTT-CCT-GGA GTA TTG-3'sp5 : 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT
 CAC ATT TCC TGG AGT ATG-3'sp6 : 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCA CA
 TTT CCT GGA GTA TC-3'sp7 : 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC ACA TTT
 CCT GGA GTA TA-3'sp8 : 5'-TGTAAC ACG ACG GCC AGT CAC A TTT CCT
 GGA GTA TTC TAC- 3'b -- all allele groups The Forward primer which can be
 amplified: DRB3ALL : 5 '-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATT CCT CTC TCT GCA
 GCA CAT TTC CTG-3' c Reverse primer : all alleles It could amplify and the
 following primers were designed as a primer.

DRB3B : 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC CGC CGC TGC ACA GTG AAA
 CTC-3' [0030] It is the electrophoresis back at 2% agarose gel about an PCR
 product, It dyed by the ethidium bromide. Using the PCR product using the primer
 which can amplify all alleles when the number of the bands of the detected
 magnification product is one, when two magnification products were checked, the
 following sequence primers determined the base sequence using two PCT products.
 M13 (-21) : 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'M13rev : 5'-CAG GAA ACA GCT
 ATG ACC-3' [0031] an PCR product -- respectively -- 1 It used for the sequence
 reaction using mul[every] BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction
 Kit and (PE Biosystems) half BD (GENPAK Ltd.). PCR product 1 mul, 3 pmol primer
 1 mul and Terminator Ready Reaction Mix 1 mul, half BD 3 mul and sterilized water
 4 mul is mixed, the conditions indicated by the attached description are followed,
 and it is 10 seconds at 96 degrees C.; It is 5 seconds at 50 degree C.; And 25 cycles
 are processed by making processing for 4 minutes into 1 cycle at 60 degrees C.
 Ethanol precipitate is carried out according to a description, and it is TSR 10 for
 ABI310 sequencers. It dissolved in mul and the sequence was performed by ABI310
 (PE Biosystems). The base sequence of each allele was collated with the base
 sequence registered into the database, and allele was determined.

[0032] (2) DRB40 (5'-GAG TGT CAT TTC TTC AAC GGG AC-3') which makes the
 40 to 62nd bases and complementary strand of beta1 domain of a cow MHC ClassII
 DR beta chain as a PCR-RFLP (method a) Forward primer, and Reverse PCR
 magnification of the genomic DNA prepared with the simple extraction method from
 the cow individual as a primer using SRB3 was carried out. After carrying out
 thermal denaturation for 4 minutes at 94 degrees C 30 cycles are amplified by
 making for [denaturation (94 degrees C)] 1 minute, for [annealing (63 degrees C)]
 2 minutes, and for [expanding (72 degrees C)] 2 minutes into 1 cycle, It elongated
 for 10 minutes at the end (72 degrees C)., Magnification of the PCR product of
 247bp(s) was expected. [0033] (b) PCR magnification of DRB100 (5'-GGA GAA
 GAG TTC GTG CGC TTC GA-3') which makes the 100 to 122nd bases and
 complementary strand of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain as a

Forward primer, and the genomic DNA prepared with the simple extraction method from the cow individual as a Reverse primer using SRB3 was carried out. After carrying out thermal denaturation in 4 minutes at 94 degrees C 30 cycles are amplified by making for [denaturation (94 degrees C)] 1 minute, for [annealing (66 degrees C)] 2 minutes, and for [expanding (72 degrees C)] 2 minutes into 1 cycle, It elongated for 10 minutes at the end (72 degrees C)., Magnification of the PCR product of 187bp(s) was expected. Electrophoresis was performed using 5% agarose gel after digesting the acquired PCR product of (a) and (b) at 37 degrees C by 2U PstI or 4U DraIII for 2 hours, and the cutting pattern was identified. [0034] (B) The base sequence of beta1 domain of the MHC ClassII DR beta chain of the BLV infection cow (Japanese Black Cattle cow) which shows result (1) PCT-SBT method each symptoms was determined. Bovine leukemia virus BLV 15 cow [lymphocytosis cows which have not shown the symptoms of leukemia although infected (precancerous state-L), And non-developed [symptoms] cow (antibody-positive health cow non-developed [symptoms]: Healthy) 43 animal], And when the amino acid of beta1 domain of the cow MHC ClassII DR beta chain of the leukemia onset cow (23 animals; Lymphoma) origin was compared, with the non-developed [symptoms] health cow, many alleles of 0701, 1302, and 1401 were intentionally accepted as compared with the leukemia onset cow. On the other hand, as compared with the non-developed [symptoms] health cow, 1601 was intentionally high with PL and an onset cow, and 1001 was intentionally high with the onset cow (Table 1). in addition, BLV the infection condition of an infection cow -- Levy et al. (827 pp.822- Levy, D., et al., and Int.J.Cancer, 19, 1977) And between (Aida, Y., et al., Cancer Res., 52, pp.6463-6470, 1992) It classified based on criteria. [0035]

[Table 1]

Allele (DRB3*)	BLV-infected cattle with								P values (vs.healthy)	
	Normal (n=400)		healthy (n=86)		PL(n=30)		lymphoma(n=46)		PL	lymphoma
	n	%	n	%	n	%	n	%		
0101	14	3.5	4	4.7	0	0	0	0	0.2966	0.1758
0201	18	4.5	4	4.7	1	3.3	5	10.9	0.6143	0.1612
0501	2	0.5	1	1.2	0	0	1	2.2	0.7414	0.5773
0502	12	3.0	1	1.2	0	0	0	0	0.7414	0.6515
0503	10	2.5	3	3.5	1	3.3	0	0	0.7254	0.2732
0701	19	4.8	7	8.1	1	3.3	0	0	0.3373	0.0456
0801	4	1.0	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
0901	7	1.8	0	0	0	0	0	0	-	-
0902	29	7.3	5	5.8	0	0	2	4.3	0.2171	0.5350
1001	70	17.5	10	11.6	3	10.0	11	23.9	0.5539	0.0581
1101	44	11.0	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
1201	34	8.5	6	7.0	1	3.3	1	2.2	0.4177	0.2291
1302	20	5.0	7	8.1	1	3.3	0	0	0.3373	0.0456
1401	8	2.0	7	8.1	0	0	0	0	0.1152	0.0456
1501	31	7.8	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
1601	51	12.8	13	15.1	14	46.7	16	34.8	0.0008	0.0095
20012	5	1.3	1	1.2	0	0	3	6.5	0.7414	0.1216
2703	6	1.5	2	2.3	0	0	0	0	0.5480	0.4227
3401	1	0.3	1	1.2	0	0	1	2.2	0.7414	0.5773
m64sp3	5	1.3	0	0	0	0	1	2.2	-	0.3485
GH2sp6	0	0.0	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
m40sp6	2	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-
m2sp3	3	0.8	0	0	0	0	0	0	-	-
new3-1	2	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-
u00127	5	1.3	0	0	0	0	0	0	-	-

[0036] Next, the amino acid sequence predicted was compared. The identification number and amino acid residue of each allele of a cow MHC ClassII DR beta chain were shown in drawing 1 . [of beta1 domain] The amino acid residue which shows a different amino acid sequence between alleles in the amino acid numbers 9–86 of beta1 domain of a cow MHC ClassII DR beta chain is shown among drawing, and a left-hand side figure is n about the number of alleles, and has shown frequency to the identification number of allele, and the pan by %. The single-character notation indicated amino acid residue among drawing. The difference in the specific amino acid sequence (71, 74, 77, and the amino acid sequence of the 78th place: motif) of beta1 domain which polymorphism is concentrating also especially in a beta chain was found out between the onset and symptoms un-developing.

[0037] Next, when the frequency of a motif was computed, the allele 71, 74, and whose amino acid of the 77 or 78th place are Lys/Arg (K/R), Glu (E), Arg (R), and Val (V), respectively was intentionally high to the cow non-developed [symptoms] as compared with PL cow and the leukemia onset cow. On the other hand, the frequency of Ala71, Ala/Asp74, and the allele of Thr77 and Tyr78 was intentionally high to PL cow or the onset cow as compared with the non-developed [symptoms] health cow (Table 2). the amino acid with which the amino acid with which the amino

acid which front Naka and the amino acid with which K71E74R/V78 are specified by the amino acid number 71 of beta1 domain of a MHC ClassII DR beta chain are Lys(es), and is specified by the amino acid number 74 is Glu, and is specified by the amino acid number 77 is Arg, and is specified by the amino acid number 78 -- Val it is -- things are shown and the same is said of others.

[0038]

[Table 2]

Epitope	BLV-infected cattle with						P values	
	healthy (n=86)		PL(n=30)		lymphoma(n=46)		(vs.healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
V ⁷⁸	31	36.0	2	6.7	5	10.9	0.0011	0.0013
Non-V ⁷⁸ (Y ⁷⁸)	55	64.0	28	93.3	41	89.1	0.0011	0.0013
R ⁷⁷	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.0018	0.0004
Non-R ⁷⁷ (T ⁷⁷)	61	70.9	29	96.7	44	95.7	0.0018	0.0004
E ⁷⁴	31	36.0	2	6.7	5	10.9	0.0011	0.0013
Non-E ⁷⁴ (N ⁷⁴)	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.3601	0.0525
(A ⁷⁴)	34	39.5	19	63.3	37	80.4	0.0206	5.1E-06
(Y ⁷⁴)	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
(S ⁷⁴)	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
K ⁷¹	37	43.0	17	56.7	18	39.1	0.1407	0.4037
Non-K ⁷¹ (R ⁷¹)	21	24.4	2	6.7	8	17.4	0.0270	0.2416
(A ⁷¹)	20	23.3	5	16.7	18	39.1	0.3163	0.9822
(E ⁷¹)	8	9.3	6	20.0	2	4.3	0.9648	0.2551
R ⁷⁷ V ⁷⁸	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.0018	1.81E-05
T ⁷⁷ V ⁷⁸	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
T ⁷⁷ Y ⁷⁸	55	64.0	28	93.3	41	89.1	0.0011	0.0013
E ⁷⁴ R ⁷⁷ V ⁷⁸	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.0002	0.0004
E ⁷⁴ T ⁷⁷ V ⁷⁸	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
A ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	34	39.5	19	63.3	37	80.4	0.0206	5.1E-06
Y ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
N ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.3601	0.0525
S ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
K ⁷¹ E ⁷⁴ R ⁷⁷ V ⁷⁸	11	12.8	0	0	0	0	0.0311	0.0071
R ⁷¹ E ⁷⁴ R ⁷⁷ V ⁷⁸	14	16.3	1	3.3	2	4.3	0.0574	0.0368
R ⁷¹ E ⁷⁴ T ⁷⁷ V ⁷⁸	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
A ⁷⁴ A ⁷⁷ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	20	23.3	5	16.7	18	39.1	0.3163	0.9822
K ⁷¹ A ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	13	15.1	14	46.7	16	34.8	0.0008	0.0095
R ⁷¹ A ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	1	1.2	0	0	3	6.5	0.7414	0.1216
E ⁷⁴ Y ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
K ⁷¹ N ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.3601	0.0525
E ⁷¹ S ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-

[0039] When the frequency of genotype was measured, the individual which has at least at least one allele 74 and whose amino acid of the 77 or 78th place are Glu, Arg, and Val was intentionally high to the cow non-developed [symptoms] as compared with PL cow and the onset cow. In this allele, the frequency of an

individual where one of the two also has the allele whose amino acid of the 71st [further] place is Lys or Arg among both allyl compounds was high as compared with PL cow and the onset cow. The frequency of the individual which, on the other hand, has the allele of Ala74, Thr77, and Tyr78 by the gay was intentionally high to the non-developed [symptoms] health cow as compared with the onset cow. The frequency of an individual where, as for such alleles, the amino acid of the 71st place has the allele which carries out the code of the amino acid which is Ala71, Ala74, Thr77, and Tyr78 although it is Ala or Lys by gay junction was high with the onset cow.

[0040] Moreover, the frequency of the individual which has the allele which carries out the code of the amino acid which is Lys71, Ala74, Thr77, and Tyr78 by gay junction was high with PL cow. Furthermore, there were many individuals which have these two alleles by the hetero intentionally with an onset cow. The non-developed [symptoms] health cow had intentionally many individuals which, on the other hand, have the allele of Ala74, Thr77, and Tyr78, and the allele of Glu74, Arg77, and Val78 by the hetero. From the above result, the allele which are Glu74, Arg77, and Val78, and the individual which has Lys/Arg71 and the allele of Glu74, Arg77, and Val78 also in it concluded that it was resistance to the onset of leukemia by BLV.

[0041]

[Table 3]

	BLV-infected cattle with						P values	
	healthy (n=43)		PL(n=15)		lymphoma(n=23)		(vs.healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
RV/RV or non-RV	22	51.2	1	6.7	2	8.7	0.0019	0.0005
TV/TV or non-TV	6	14.0	1	6.7	3	13.0	0.4113	0.6173
TY/TY or non-TY	39	90.7	15	100.0	23	100.0	0.2909	0.1712
ERV/ERV or Non-ERV	22	51.2	2	13.3	2	8.7	0.0098	0.0005
ERV/Non-ERV	19	44.2	2	13.3	2	8.7	0.0298	0.0025
ETV/ETV or Non-ETV	6	14.0	0	0	3	13.0	0.1506	0.6173
ATY/ATY or Non-ATY	28	65.1	14	93.3	21	91.3	0.0317	0.0178
ATY/Non-ATY	22	51.2	10	66.7	5	21.7	0.2314	0.0186
NTY/NTY or Non-NTY	12	27.9	3	20.0	2	8.7	0.4083	0.0620
YTY/YTY or Non-YTY	8	18.6	5	33.3	2	8.7	0.9343	0.2445
STY/STY or Non-STY	0	0	1	6.7	0	0	0.2586	-
ERV/ERV	3	7.0	0	0	0	0	0.4000	0.4987
ERV/ATY	10	23.3	2	13.3	1	4.3	0.3397	0.0464
ERV/NTY	5	11.6	0	0	1	4.3	0.2101	0.3108
ERV/YTY	3	7.0	0	0	0	0	0.4000	0.2697
ERV/ETV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
ETV/ATY	3	7.0	0	0	3	13.0	0.4000	0.3456
ETV/NTY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
ATY/ATY	6	14.0	5	33.3	16	69.6	0.9750	8.8E-06
ATY/NTY	4	9.3	2	13.3	0	0	0.8275	0.1712
ATY/YTY	5	11.6	4	26.7	1	4.3	0.9588	0.3108
ATY/STY	0	0	1	6.7	0	0	0.2586	-
NTY/NTY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
NTY/YTY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.2586	0.3485
KERV/KERV or non-KERV	10	23.3	0	0	0	0	0.0367	0.0091
KERV/ non-KERV	9	20.9	0	0	0	0	0.0530	0.0152
RERV/RERV or Non-RERV	13	30.2	1	6.7	2	8.7	0.0618	0.0418
RERV/ Non-RERV	12	27.9	1	6.7	2	8.7	0.0845	0.0620
RETV/RETV or Non-RETV	6	14.0	1	6.7	3	13.0	0.4113	0.6173
KATY/KATY or Non-KATY	13	30.2	11	73.3	14	60.9	0.0045	0.0159
KATY/ Non-KATY	13	30.2	8	53.3	12	52.2	0.0994	0.0694
AATY/AATY or Non-AATY	19	44.2	5	33.3	14	60.9	0.3366	0.1507
AATY/ Non-AATY	18	41.9	5	33.3	10	43.5	0.3959	0.6521
KNTY/KNTY or Non-KNTY	12	27.9	3	20.0	1	4.3	0.4083	0.0190
EYTY/EYTY or Non-EYTY	7	16.3	5	33.3	2	8.7	0.9579	0.3256

[0042]

[Table 4]

	BLV-infected cattle with						P values	
	healthy (n=43)		PL(n=15)		lymphoma(n=23)		(vs.healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
KERV/KERV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
KERV/RERV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
KERV/AATY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
KERV/KNTY	3	7.0	0	0	0	0	0.4000	0.2697
KERV/EYTY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
KERV/KATY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RERV/RERV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RERV/RETV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RERV/KATY	4	9.3	1	6.7	0	0	0.6141	0.1712
RERV/AATY	3	7.0	0	0	1	4.3	0.4000	0.5651
RERV/KNTY	2	4.7	0	0	1	4.3	0.5463	0.7236
RERV/EYTY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RETV/KATY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.2586	0.3485
RETV/AATY	3	7.0	0	0	2	8.7	0.4000	0.7747
RETV/KNTY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
KATY/KATY	0	0	3	20.0	2	8.7	0.0147	0.1179
KATY/RATY	1	2.3	0	0	3	13.0	0.7414	0.1179
KATY/AATY	4	9.3	2	13.3	7	30.4	0.8275	0.0345
KATY/KNTY	1	2.3	1	6.7	0	0	0.4537	0.6515
KATY/EYTY	2	4.7	3	20.0	1	4.3	0.1031	0.7236
AATY/AATY	1	2.3	0	0	4	17.4	0.7414	0.0464
AATY/KNTY	3	7.0	1	6.7	0	0	0.7272	0.2697
AATY/EYTY	3	7.0	1	6.7	0	0	0.7272	0.2697
AATY/ESTY	0	0	1	6.7	0	0	0.2586	-
KNTY/KNTY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
KNTY/EYTY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.2586	0.3485

[0043] (2) When the base sequence of beta1 domain of the MHC ClassII DR beta chain of the 281 PCR-RFLP method Japanese Black Cattle cows was determined, the 71st to nine kinds of 80th amino acid sequences (a base sequence 211-240) were acquired (drawing 2 A). When PCR magnification of the allele which has K71E74R77V78 which show resistance to the onset of leukemia, and R71E74R77V78 was carried out in this using SRB3 and DRB40 primer or SRB3, and DRB100 primer and that product was processed by PstI and DraIII, the digestive product by both restriction enzymes was not acquired, but was detected as one band on agarose gel (drawing 2 B).

[Layout Table]

SEQUENCE-LISTING<110> RIKEN<120> A method for-judging-a-resistance to-the-onset-of-bovine leukemia<130> A01095M<160> 19<210> 1<211> 38<212> DNA<213> Artificial Sequence<400> 1tgtaaaacga cggccagtag-cacatttcct gcagtatc 38<210> 2<211> 42<212> DNA<213> Artificial Sequence <400> 2tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct ggagtattct aa 42 <210> 3 <211> 39<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 3 tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct ggagtatta 39 <210> 4

<211> 39<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 4 tgtaaaacga
cggccagtagcacatttcct ggagtattg 39 <210> 5<211> 36<212> DNA <213> Artificial
Sequence <400> 5 tgtaaaacga cggccagtca catttcctgg agtatg 36 <210> 6 <211>
37<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 6 tgtaaaacga cggccagtgc acatttcctg
gagtatc 37 <210> 7 <211> 38<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 7
tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct ggagtata 38 <210> 8 <211> 40<212> DNA<213>
Artificial Sequence <400> 8tgtaaaacga cggccagtca catttcctgg agtattctac 40 <210> 9
<211> 39<212> DNA<213> Artificial Sequence <400> 9 caggaaacag ctatgacccg
ccgctgcaca gtgaaactc 39 <210> 10 <211> 28<212> DNA <213> Artificial Sequence
<400> 10 ggaattcctc tctctgcagc acatttc 28 <210> 11<211> 26<212> DNA <213>
Artificial Sequence <400> 11 tttaaattcg cgctcacctc gccgct 26 <210> 12 <211>
45<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 12 tgtaaaacga cggccagtat tcctctctct
gcagcacatt tcctg 45 <210> 13 <211> 18<212> DNA <213> Artificial Sequence <400>
13tgtaaaacga cggccagt 18 <210> 14 <211> 18<212> DNA <213> Artificial Sequence
<400> 14caggaaacag ctatgacc 18 <210> 15 <211> 29<212> DNA <213> Artificial
Sequence <400> 15 ggaattcctc tctctgcagc acatttcct 29 <210> 16 <211> 26<212>
DNA <213> ArtificialSequence <400> 16 aagtcgaccg ctgcacagtg aaactc 26 <210> 17
<211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 17 gagtgtcatt tttcaacgg gac
23 <210> 18 <211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 18 ggagaagagt
tcgtgcgctt cga 23 <210> 19 <211> 40<212> DNA <213> Artificial Sequence <400>
19 tgtaaaacga cggccagtct ctctctgcag cacatttcct

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing having shown the result of having determined the base sequence of beta1 domain of the MHC ClassII DR beta chain of the BLV infection cow (Japanese Black Cattle cow) which shows each symptoms, and having compared the amino acid sequence predicted. The figure of an upper case shows the number of amino acid residue among drawing, and a left-hand side figure is the identification number of allele. The single-character notation indicated amino acid residue.

[Drawing 2] It is drawing having shown the result of having digested the 71st to the 80th nine kinds of beta1 domain of the MHC ClassII DR beta chain obtained from 281 Japanese Black Cattle cows of amino acid sequences, and the base sequence which carries out the code of the amino acid sequence with the restriction enzyme (PstI and DraIII). Among drawing, (A) shows the determined base sequence and its amino acid sequence predicted, and (B) shows the result of restriction enzyme processing.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-238679

(P2001-238679A)

(43)公開日 平成13年9月4日(2001.9.4)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		C 1 2 Q 1/34	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/34		1/68	A 4 H 0 4 5
1/68		1/70	
1/70		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		審査請求 未請求 請求項の数5	O L (全 14 頁)

(21)出願番号 特願2000-56093(P2000-56093)

(22)出願日 平成12年3月1日(2000.3.1)

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(71)出願人 598122278

間 陽子

茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャ

レールつくば3-105

(72)発明者 間 陽子

茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャ

レールつくば松代3-105

(74)代理人 100092635

弁理士 塩澤 寿夫 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 牛白血病の発症抵抗性の判定方法

(57)【要約】

【課題】 ウシ個体のウシ白血病ウイルス(BLV) に対する白血病発症の抵抗性を遺伝子工学的な手法で簡便かつ高精度に判定する方法を提供する。

【解決手段】 ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DRβ鎖のβ1ドメインのアミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を白血病に対する発症抵抗性ありと判定する方法、及びさらにアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgである場合にそのウシ個体を白血病に対する発症抵抗性が高いと判定する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を白血病に対する発症抵抗性ありと判定する方法。

【請求項2】 さらにアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgである場合にそのウシ個体を白血病に対する発症抵抗性が高いと判定する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、下記の工程：

(1)ウシ個体から分離したゲノムDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNA を含むPCR 産物を調製する工程：及び

(2)上記PCR 産物に含まれるDNA によりコードされるアミノ酸配列において、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する工程：を含む方法。

【請求項4】 さらにアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgである場合にそのウシ個体を白血病に対する発症抵抗性が高いと判定する請求項3に記載の方法。

【請求項5】 白血病に対する発症抵抗性が高いウシ個体を選別する方法であって、下記の工程：

(1) ForwardプライマーとしてDRB40又はDRB100及びReverse プライマーとしてSRB3を用いてウシ個体から分離したゲノムDNA をポリメラーゼ連鎖反応(PCR) により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNA を含むPCR 産物を調製する工程：及び

(2)上記PCR産物がPstI及びDraIIで消化されない場合にそのウシ個体が白血病に対する発症抵抗性が高いと判定する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を評価する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】主要組織適合抗原(MHC) は、生体の感染防御機構において自己-非自己の識別に関与する分子であり、 α 鎖及び β 2MからなるクラスIと α 鎖及び β 鎖か

らなるクラスIIとからなり、それぞれの α 1と α 2ドメイン及び α 1と β 1ドメインには抗原ペプチドを噛み込む溝が存在している。そして、この溝に収容された断片化ペプチドのみがT細胞レセプターによって認識されるという特徴を有しており、クラスIを認識したCD8+細胞によって細胞死(細胞性免疫)が達成され、クラスIIを認識した CD4+ 細胞によって主として抗体産生(液性免疫)が誘導される。

【0003】MHC は最も多型に富んだ遺伝子群であり、そのハプロタイプによってペプチド収容溝のポケットの位置、形、大きさ、及び性状が異なり、それに伴って噛み込まれる断片化ペプチドの結合状態が変化し、個体ごとの免疫応答及び疾患感受性を決定しているものと考えられている。MHC ハプロタイプと疾患抵抗性(抗病性)又は発症可能性(易病性)との相関については、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV)、及びマラリヤに関する報告がある。一方、ウシMHC(BoLA) クラスII遺伝子については、これまでに DQA, DQB, DRA, DRB, DNA, DOB, DYA, 及びDYB 遺伝子の存在が推測されている。なかでも、DRB遺伝子座において同定されている3つの遺伝子(DRB1 ~B3)のうち、DRB3については機能的な蛋白質をコードすることが知られており、現在までに73種類の対立遺伝子の存在が明らかにされている。しかしながら、ウシの感染性疾患とウシMHC(BoLA) ハプロタイプとの相関については従来ほとんど報告がない。

【0004】特に、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)と同様にウイルス増殖を調節する遺伝子PXを有しており、HTLV-1に最も近縁のレトロウイルスであるウシ白血病ウイルス(BLV) については、ウシMHC(BoLA) ハプロタイプと持続性リンパ球増多症との相関に関して米国のグループが抗病性を中心に報告しているが、白血病発症可能性との関連性の報告は全くない。このウイルスに感染したウシの割合(日本における感染率)は10~20%であり、そのうちの1 ~2 %は10~15年程度という長期の潜伏期間の後に極めて悪性の地方病性ウシ白血病を発症して死に至るので、このウイルスが引き起こす畜産農家への経済的損失は非常に深刻である。ウシMHC(BoLA)ハプロタイプの解析によってBLV 感染後のウシの発症可能性を簡単に判定できるようになれば、発症抵抗性のウシを予め選択して飼育することが可能になり、極めて安全にウシの飼育を継続することが可能になるものと期待される。

【0005】一方、本発明者らは、先にウシMHC(BoLA) クラスII遺伝子のうち、DRB 遺伝子座の構造を解析して、DRB3遺伝子(BoLA-DRB3) 及びその遺伝子産物の構造を明らかにした(Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp. 981-988, 1995)。本発明者はさらにこの遺伝子の機能を研究するうち、白血病発症牛と未発症牛とでは、BoLA-DRB3 の中で特に多型が認められる第二エクソン(β 1ドメイン)からの遺伝子産物において、明らかに

アミノ酸配列の異なる部分が存在することを見いだした。また、このアミノ酸置換が、BLV に対する発症可能性及び発症抵抗性に直接関与していることを見いだした。このような知見を基にして、本発明者らは、ウシ白血病ウイルスBLV に対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する方法を完成した(国際公開98/3680号)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】本発明の課題は、ウシ白血病ウイルス(BLV)とウシMHC(BoLA)ハプロタイプとの相関を解明し、ウシ個体のウシ白血病ウイルス(BLV)に対する白血病発症の抵抗性を遺伝子工学的な手法で簡便かつ高精度に判定する方法を提供することにある。より具体的には、上記の国際公開98/3680号に記載された判定方法よりもさらに高精度な判定を可能にする判定方法を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の判定方法に有用なプライマー・セットを提供することにある。

【0007】本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行ったところ、特にウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号77で特定されるArgがウシ白血病の発症抵抗性に重要な意義を有していることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明は、ウシ白血病ウイルスBLVに対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGlu(グルタミン酸)であり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArg(アルギニン)であり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal(バリン)であるウシ個体を白血病に対する発症抵抗性ありと判定する方法を提供するものである。

【0009】また、本発明により、ウシ白血病ウイルスBLVに対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、ウシ個体のウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys(リジン)又はArgであり、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体を白血病に対する発症抵抗性が高いと判定する方法を提供するものである。これらの発明の好ましい態様によれば、ウシ白血病ウイルスBLVに感染したウシに対して行う上記方法が提供される。

【0010】本発明の別の態様によれば、ウシ白血病ウイルスBLVに対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、下記の工程：

(1)ウシ個体から分離したゲノムDNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNAを含むPCR産物を調製する工程；及び

(2)上記PCR産物に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列において、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体を白血病の発症抵抗性ありと判定する工程；を含む方法が提供される。

【0011】また、ウシ白血病ウイルスBLVに対するウシの白血病発症の抵抗性を判定する方法であって、下記の工程：

(1)ウシ個体から分離したゲノムDNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNAを含むPCR産物を調製する工程；及び

(2)上記PCR産物に含まれるDNAによりコードされるアミノ酸配列において、ウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgであり、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体を白血病に対する発症抵抗性が高いと判定する工程；を含む方法が本発明により提供される。

【0012】さらに本発明により、白血病に対する発症抵抗性が高いウシ個体を簡便に選別する方法が提供される。この方法は、下記の工程：

(1) ForwardプライマーとしてDRB40及びReverseプライマーとしてSRB3を用いてウシ個体から分離したゲノムDNAをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅してウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの一部又は全部をコードするDNAを含むPCR産物を調製する工程；及び

(2)上記PCR産物がPstI及びDraIIIで消化されない場合にそのウシ個体が白血病に対する発症抵抗性が高いと判定する工程を含む方法が提供される。この方法で選別されたウシ個体は、MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインにおいてアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgであり、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValである。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、ウシ白血病ウイルスBLVに感染したウシ、又はウシ白血病ウイルスBLVに未感染のウシについて、その個体の白血病発症の抵抗性を判定する方法である。ウシ個体がウシ白血病ウイルスBLVに感染しているか否かは、抗ウシ白血病ウイルスBLV抗体を用いた試験により容易に確認することが可能

である。

【0014】本発明の好ましい態様では、ウシ個体からゲノムDNAを分離した後、PCR法によってウシMHC Class II のDR β 鎖の β 1ドメイン (DRB3遺伝子の第二エクソン)の一部又は全部をコードする遺伝子の特異的に増幅し、得られたPCR産物のシーケンシングを行って β 1ドメインのアミノ酸番号71から78で特定されるアミノ酸配列を推定する。このアミノ酸配列において、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体は白血病に対する発症抵抗性ありと判定される。また、アミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgであり、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体は白血病に対して高い発症抵抗性を有していると判定される。

【0015】対立遺伝子の少なくとも一方において β 1ドメインの上記アミノ酸配列が上記の特定のアミノ酸残基を含む場合には、そのウシ個体は白血病に対して抵抗性を有しているが、上記の判定をより正確に行うためには、対立遺伝子 (ハプロタイプ) における上記アミノ酸配列を比較することが好ましい。両方の対立遺伝子の上記アミノ酸配列 (アミノ酸番号71-78) において、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体は白血病に対して発症抵抗性が高い。また、両方の対立遺伝子の上記アミノ酸配列 (アミノ酸番号71-78) において、アミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgであり、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであるウシ個体は白血病に対して特に高い抵抗性を有している。

【0016】ウシMHC Class II DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸配列については、間ら (Aida, Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, pp.981-988, 1995) による報告がある。国際公開98/3680号の第1図には、ウシMHC Class II DR β 鎖のmRNAの構造(A)及びcDNAの全長と遺伝子産物のアミノ酸配列(B)が示されているが、図中、 β 1ドメインはアミノ酸番号1からアミノ酸番号94までのアミノ酸配列により特定される部分である。

【0017】本発明の判定方法の対象となるウシは特に限定されず、ウシ白血病ウイルスBLVに感染する可能性があり、感染により白血病を発症する可能性があるものであれば、乳用種、乳肉兼用種、肉用種、役用種、及び役肉兼用種などのいかなるウシを対象としてもよい。具

体的には、例えば、黒毛和種、日本短角などの和牛、ホルスタイン、ジャージー、ヘレフォード、アバディーン・アンガス、フリーシェン等の品種を挙げることができるが、これらの品種に限定されることはない。

【0018】ウシ個体からゲノムDNAを調製するための試料としては、末梢血や臓器などを利用することができる。臓器としては、例えば、リンパ節などの組織片を用いることができる。上記の試料からゲノムDNAを調製する方法としては、当業者に利用可能なものであればいかなるものを利用してもよい。試料として末梢血白血球、又は末梢血リンパ球を用いる場合には、例えば、Hughesらの方法 (Hughes, S.H. et al., Cell, 15, pp.1397-1410, 1978)を用いることができる。臓器を用いる場合には、例えば、凍結した組織片をハサミで薄切した後、ドデシル硫酸ナトリウム、フェノールクロロホルム法 (McKnight, G.S., Cell, 14, pp.403-413, 1978)により調製することができる。また、細胞からのゲノムDNAの簡便抽出法を用いてもよい。その具体例は、国際公開98/3680号の実施例に示されている。

【0019】調製したゲノムDNAをPCR法により増幅するにあたり使用するプライマーとしては、ウシMHC Class II のDR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号75から78までの部分アミノ酸配列又は β 1ドメインの全長をコードする遺伝子を含むDNAを増幅できるものであれば、いかなるものを用いてもよい。

【0020】本発明の方法に特に好適に使用可能なプライマーのセットとして、サイクルシーケンシング及びダイナビーズDNA直接シーケンス等の直接シーケンス法が可能な下記のプライマーセット(1)：

Aプライマー：5'-TGTAACGACGGCCAGTCTCTCTGCAGCACATTTCCT-3'；及び

Bプライマー：5'-CAGGAACAGCTATGACCGCCGCTGCACAGTGAAGTC-3'

を挙げることができる。

【0021】また、制限酵素サイトを付加したプライマーセットとして、プライマー・セット(2)

Aプライマー：5'-GGAATTCCTCTCTGCAGCACATTTCCT-3'；及び

Bプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAAGTC-3'、又はプライマー・セット(3)

Aプライマー：5'-GAGTGTCAATTTCTCAACGGGAC-3'、5'-GGAAGAGATTCGTGCGCTTCGA-3'、及び
5'-GGAATTCCTCTCTGCAGCACATTTCCT-3'

からなる群から選ばれるプライマー；

Bプライマー：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAAGTC-3'を利用することができる。

【0022】特に、プライマー・セット(3)を用いて増幅したPCRアリルをPstIで消化した後、切断パターンの違いを判定することにより、そのウシ個体が白血病抵抗性であるか否かを簡便に判定できる。

【0023】さらに、プライマー・セット(4)：

Aプライマー DRB40：5'-GAGTGTCTTCTTCAACGGGAC-3'、

Bプライマー-SRB3：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAAACTC-3'

又はプライマー・セット(5)：

Aプライマー DRB100：5'-GGAGAAGAGTTCGTGCGCTTCGA-3'

Bプライマー-SRB3：5'-AAGTCGACCGCTGCACAGTGAAACTC-3'

を用いて増幅したPCR アリルにPstI及びDraIIIを作用させ、増幅産物が消化されなかった場合には、そのウシ個体はウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLys又はArgであり、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、かつアミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がVal であると判定でき、白血病に対して高い抵抗性を有することが簡便に判定できる。もっとも、本発明の方法に利用可能なプライマー及びプライマー・セットはこれらに限定されることはない。

【0024】PCR 法に用いるDNA 量は適宜選択可能であるが、例えば、末梢血白血球又は末梢血リンパ球を用いる場合には0.1~0.5 μ g 程度である。また、上記のようにして増幅されたDNA (PCR産物)のシーケンス決定法としては、当業者に利用可能なものであればいかなるものを利用してもよいが、例えば、直接シーケンス法などを用いることが好ましい。その具体例は、国際公開98/3680号の実施例に詳細に記載されている。

【0025】なお、多くのウシはヘテロ接合体(heterozygote)であり、父親又は母親由来の対立遺伝子の塩基配列が異なると、直接シーケンス法ではどちらの対立遺伝子なのかを決定することができないことがある。このような場合、上記のプライマー・セット(2)を用いて増幅されたPCR 産物を制限酵素EcoRIおよびSal Iで消化後、ベクターにサブクローニングして、片方の対立遺伝子のみの塩基配列を決定して比較することにより、もう一方の対立遺伝子の塩基配列を確実に決定することが可能になる。より正確に遺伝子情報を得るためには、PCR 産物から両方の対立遺伝子をサブクローニングしてそれぞれの塩基配列を決定することが好ましい。その具体的方法及び利用可能なプライマーも国際公開98/3680号の実施例に詳細に記載されている。

【0026】実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。なお、以下の実施例において用いられるプライマーの使用意義とウシMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのタイピングの詳細については、特願平11-373483号明細書に記載されている。

【0027】(A)材料と方法

(1)PCT-SBT法

120 μ Mの各dNTP、1.5 mMのMgCl₂、0.2 μ Mの各プライマ

ー、2ユニットの組み替えTaq DNA伸長酵素(rTaq) (TOYOBO)を含む50 μ lの \times 1 rTaq緩衝液 [10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0.1% TritonX-100]にウシ個体より簡易抽出法により調製したゲノムDNA 20~40 μ gを溶解した。変性処理を95°Cで5分間行い、次に95°Cで40秒;60°Cで30秒;及び72°Cで40秒の処理を1サイクルとして20サイクルの処理の後、さらに72°Cで2分間伸長させた プライマーとしては、ウシMHC Class II DR β 鎖：BoLA-DR β)の β 1ドメインをコードするDRB3遺伝子の第二エクソンをPCR法により特異的に増幅できるプライマーを用いた。

ERB3N：5'-GGA ATT CCT CTC TCT GCA GCA CAT TTC C-3'

HL031：5'-TTT AAA TTC GCG CTC ACC TCG CCG CT-3'

【0028】上記のPCRで得られた産物のうち1 μ lを8種類の対立遺伝子群特異的プライマー及び全ての対立遺伝子を増幅できるForwardプライマーを用いたPCR (PCR-SSP)法で増幅させた。120 μ Mの各dNTP、1.5 mMのMgCl₂、0.2 μ Mの対立遺伝子群特異的Forwardプライマー、200 μ MのReverseプライマー、及び1ユニットのAmpliTaq Gold™ DNA伸長酵素 (PE Biosystems)、1 μ lの上記PCR産物を含む25 μ lの \times 1GeneAmp® Gold Bufferに対して変性処理を95°Cで10分間行い、次に95°Cで1分間;64°Cで30秒;及び72°Cで30秒の処理を1サイクルとして20サイクルの処理を行い、さらに72°Cで5分間伸長させた

【0029】a)対立遺伝子群特異的Forwardプライマー：BoLA-DRB3 第二エクソンがコードするアミノ酸の配列により、対立遺伝子を8群に分け、各々を特異的に増幅できる以下のプライマーを設計した。

sp1：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC ACA TTT CCT GCA GTA TC -3'

sp2：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC ACA TTT CCT GCA GTA TTC TAA -3'

sp3：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC ACA TTT CCT GCA GTA TTA -3'

sp4：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC ACA TTT CCT GCA GTA TTG -3'

sp5：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAC ATT TCC TGG A GT ATG -3'

sp6：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCA CA TTT CCT GCA GTA TC -3'

sp7：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC ACA TTT CCT GCA GTA TA -3'

sp8：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAC A TTT CCT GCA GTA TTC TAC -3'

b)全ての対立遺伝子群を増幅できるForwardプライマー：

DRB3ALL：5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATT CCT CTC TCT GCA GCA CAT TTC CTG-3'

c) Reverseプライマー：全ての対立遺伝子を増幅できず

ライマーとして以下のプライマーを設計した。

DRB3B : 5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC CGC CGC TGC AC
A GTG AAA CTC -3'

【0030】PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動後
エチジウムブロマイドで染色を施した。検出された増
幅産物のバンドが1つの場合は全ての対立遺伝子を増幅
できるプライマーを用いたPCR産物を用い、2つの増幅産
物が確認された場合は2つのPCT産物を用いて、以下のシ
ーケンスプライマーにより塩基配列を決定した。

M13(-21): 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'

M13rev: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3'

【0031】PCR産物をそれぞれ1 μ lずつBigDye™ Ter
minator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Bi
osystems)およびhalf BD (GENPAK Ltd.)を用いたシーケ
ンス反応に用いた。PCR産物1 μ l、3 pmolプライマー 1
 μ l、Terminator Ready Reaction Mix 1 μ l、half BD
3 μ l、及び滅菌水4 μ lを混合し、添付の説明書に記
載された条件に従って96°Cで10秒; 50°Cで5秒; 及び60
°Cで4分間の処理を1サイクルとして25サイクルの処理を
行い、説明書に従ってエタノール沈殿し、ABI310シーケ
ンサー用のTSR 10 μ lに溶解し、ABI310 (PE Biosystem
s)でシーケンスを行った。それぞれの対立遺伝子の塩基
配列をデータベースに登録されている塩基配列と照合
し、対立遺伝子を決定した。

【0032】(2)PCR-RFLP法

(a)ForwardプライマーとしてウシMHC ClassII DR β 鎖の
 β 1ドメインの40-62番目の塩基と相補鎖を作るDRB40
(5'-GAG TGT CAT TTC TTC AAC GGG AC-3')、及びReverse
プライマーとしてSRB3を使用してウシ個体より簡易抽
出法により調製したゲノムDNAをPCR増幅した。94°Cで4
分間熱変性した後 変性(94°C)1分間 アニーリング(63
°C) 2分間、伸長(72°C)2分間を1サイクルとして30サイ
クルの増幅を行い 最後に伸長(72°C)を10分間行った。

247bpのPCR産物の増幅が予想された

【0033】(b)ForwardプライマーとしてウシMHC Clas
sII DR β 鎖の β 1ドメインの100-122番目の塩基と相補
鎖を作るDRB100 (5'-GGA GAA GAG TTC GTG CGC TTC GA-
3')、及びReverseプライマーとしてSRB3を使用してウシ
個体より簡易抽出法により調製したゲノムDNAをPCR増幅
した。94°Cで4分間で熱変性した後 変性(94°C)1分間
アニーリング(66°C)2分間、伸長(72°C)2分間を1サイク
ルとして30サイクルの増幅を行い 最後に伸長(72°C)を
10分間行った 187bpのPCR産物の増幅が予想された 得
られた(a)及び(b)のPCR産物を2U PstI又は4U DraIIIで3
7°Cで2時間消化した後 5%アガロースゲルを用いて電気
泳動を行い切断パターンを識別した

【0034】(B)結果

(1)PCT-SBT法

各病態を示すBLV感染牛(黒毛和種牛)のMHC ClassII D
R β 鎖の β 1ドメインの塩基配列を決定した。ウシ白血
病ウイルスBLV に感染しているものの白血病を発症して
いないウシ[リンパ球増多症牛(前癌状態:PL)15頭、
及び未発症牛(抗体陽性健康未発症牛:Healthy)43
頭]、及び白血病発症牛(23頭;Lymphoma)由来のウシ
MHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインのアミノ酸を比較し
たところ、未発症健康牛では白血病発症牛に比較して07
01、1302、及び1401の対立遺伝子が有意に多く認められ
た。一方、未発症健康牛に比較してPLおよび発症牛では
1601が有意に高く、発症牛では1001が有意に高かった
(表1)。なお、BLV 感染牛の感染状態は、レヴィーら
(Levy, D., et al., Int. J. Cancer, 19, pp.822-82
7,1977) 及び間ら (Aida, Y., et al., Cancer Res., 5
2, pp.6463-6470, 1992)の基準に基づいて分類した。

【0035】

【表1】

Allele (DRB3*)	Normal (n=400)		BLV-infected cattle with						P values	
			healthy (n=86)		PL(n=30)		lymphoma(n=46)		(vs.healthy)	
			n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
0101	14	3.5	4	4.7	0	0	0	0	0.2966	0.1758
0201	18	4.5	4	4.7	1	3.3	5	10.9	0.6143	0.1612
0501	2	0.5	1	1.2	0	0	1	2.2	0.7414	0.5773
0502	12	3.0	1	1.2	0	0	0	0	0.7414	0.6515
0503	10	2.5	3	3.5	1	3.3	0	0	0.7254	0.2732
0701	19	4.8	7	8.1	1	3.3	0	0	0.3373	0.0456
0801	4	1.0	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
0901	7	1.8	0	0	0	0	0	0	-	-
0902	29	7.3	5	5.8	0	0	2	4.3	0.2171	0.5350
1001	70	17.5	10	11.6	3	10.0	11	23.9	0.5539	0.0581
1101	44	11.0	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
1201	34	8.5	6	7.0	1	3.3	1	2.2	0.4177	0.2291
1302	20	5.0	7	8.1	1	3.3	0	0	0.3373	0.0456
1401	8	2.0	7	8.1	0	0	0	0	0.1152	0.0456
1501	31	7.8	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
1601	51	12.8	13	15.1	14	46.7	16	34.8	0.0008	0.0095
20012	5	1.3	1	1.2	0	0	3	6.5	0.7414	0.1216
2703	6	1.5	2	2.3	0	0	0	0	0.5480	0.4227
3401	1	0.3	1	1.2	0	0	1	2.2	0.7414	0.5773
m64sp3	5	1.3	0	0	0	0	1	2.2	-	0.3485
GH2sp6	0	0.0	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
m40sp6	2	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-
m2sp3	3	0.8	0	0	0	0	0	0	-	-
new3-1	2	0.5	0	0	0	0	0	0	-	-
u00127	5	1.3	0	0	0	0	0	0	-	-

【0036】次にその予測されるアミノ酸配列を比較した。図1にウシMHC ClassII DRβ鎖のβ1ドメインの各対立遺伝子の識別番号とアミノ酸残基を示した。図中、ウシMHC ClassII DRβ鎖のβ1ドメインのアミノ酸番号9から86の中で対立遺伝子間で異なるアミノ酸配列を示すアミノ酸残基を示し、左側の数字は対立遺伝子の識別番号、さらに対立遺伝子の数をnで、頻度を%で示してある。図中、アミノ酸残基は一文字表記で記載した。β鎖の中でも特に多型が集中しているβ1ドメインの特定のアミノ酸配列(71、74、77、および78位のアミノ酸配列:モチーフ)の違いが発症と未発症の間に見いだされた。

【0037】次に、モチーフの頻度を算出したところ、

71、74、77、78位のアミノ酸がそれぞれLys/Arg (K/R)、Glu(E)、Arg(R)、Val (V)である対立遺伝子がPL牛および白血病発症牛に比較して未発症牛に有意に高かった。一方、Ala⁷¹、Ala/Asp⁷⁴、Thr⁷⁷、Tyr⁷⁸の対立遺伝子の頻度が、未発症健康牛に比較してPL牛あるいは発症牛に有意に高かった(表2)。表中、K⁷¹E⁷⁴R⁷⁷V⁷⁸はMHC ClassII DRβ鎖のβ1ドメインのアミノ酸番号71で特定されるアミノ酸がLysであり、アミノ酸番号74で特定されるアミノ酸がGluであり、アミノ酸番号77で特定されるアミノ酸がArgであり、アミノ酸番号78で特定されるアミノ酸がValであることを示し、他も同様である。

【0038】

【表2】

Epitope	BLV-infected cattle with						P values	
	healthy (n=86)		PL(n=30)		lymphoma(n=46)		(vs.healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
V ⁷⁸	31	36.0	2	6.7	5	10.9	0.0011	0.0013
Non-V ⁷⁸ (Y ⁷⁸)	55	64.0	28	93.3	41	89.1	0.0011	0.0013
R ⁷⁷	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.0018	0.0004
Non-R ⁷⁷ (T ⁷⁷)	61	70.9	29	96.7	44	95.7	0.0018	0.0004
E ⁷⁴	31	36.0	2	6.7	5	10.9	0.0011	0.0013
Non-E ⁷⁴ (N ⁷⁴)	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.3601	0.0525
(A ⁷⁴)	34	39.5	19	63.3	37	80.4	0.0206	5.1E-06
(Y ⁷⁴)	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
(S ⁷⁴)	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
K ⁷³	37	43.0	17	56.7	18	39.1	0.1407	0.4037
Non-K ⁷³ (R ⁷³)	21	24.4	2	6.7	8	17.4	0.0270	0.2416
(A ⁷³)	20	23.3	5	16.7	18	39.1	0.3163	0.9822
(E ⁷³)	8	9.3	6	20.0	2	4.3	0.9648	0.2551
R ⁷⁷ V ⁷⁸	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.0018	1.81E-05
T ⁷⁷ V ⁷⁸	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
T ⁷⁷ Y ⁷⁸	55	64.0	28	93.3	41	89.1	0.0011	0.0013
E ⁷⁴ R ⁷⁷ V ⁷⁸	25	29.1	1	3.3	2	4.3	0.0002	0.0004
E ⁷⁴ T ⁷⁷ V ⁷⁸	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
A ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	34	39.5	19	63.3	37	80.4	0.0206	5.1E-06
Y ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
N ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.3601	0.0525
S ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-
K ⁷³ E ⁷⁴ R ⁷⁷ V ⁷⁸	11	12.8	0	0	0	0	0.0311	0.0071
R ⁷⁷ E ⁷⁴ R ⁷⁷ V ⁷⁸	14	16.3	1	3.3	2	4.3	0.0574	0.0368
R ⁷⁷ E ⁷⁴ T ⁷⁷ V ⁷⁸	6	7.0	1	3.3	3	6.5	0.4177	0.6148
A ⁷⁴ A ⁷³ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	20	23.3	5	16.7	18	39.1	0.3163	0.9822
K ⁷³ A ⁷³ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	13	15.1	14	46.7	16	34.8	0.0008	0.0095
R ⁷⁷ A ⁷³ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	1	1.2	0	0	3	6.5	0.7414	0.1216
E ⁷⁴ Y ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	8	9.3	5	16.7	2	4.3	0.9203	0.2551
K ⁷³ N ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	13	15.1	3	10.0	2	4.3	0.3601	0.0525
E ⁷⁴ S ⁷⁴ T ⁷⁷ Y ⁷⁸	0	0	1	3.3	0	0	0.2586	-

【0039】遺伝子型の頻度を比較したところ、74、77、78位のアミノ酸がGlu、Arg、Valである対立遺伝子を少なくとも一つでも有する個体がPL牛および発症牛に比較して未発症牛に有意に高かった。この対立遺伝子において、さらに71位のアミノ酸がLysかArgである対立遺伝子を両アレルのうち片方でも有する個体の頻度は、PL牛および発症牛に比較して高かった。一方、Ala⁷⁴、Thr⁷⁷、Tyr⁷⁸の対立遺伝子をホモで有する個体の頻度は、発症牛に比較して未発症健康牛に有意に高かった。これらの対立遺伝子は、71位のアミノ酸がAla又はLysであるが、Ala⁷¹、Ala⁷⁴、Thr⁷⁷、Tyr⁷⁸であるアミノ酸をコードする対立遺伝子をホモ接合で有する個体の頻度は発症牛で高かった。

【0040】また、Lys⁷¹、Ala⁷⁴、Thr⁷⁷、Tyr⁷⁸であるアミノ酸をコードする対立遺伝子をホモ接合で有する個体の頻度はPL牛で高かった。さらに、これら2つの対立遺伝子をヘテロで有する個体は発症牛で有意に多かった。一方、Ala⁷⁴、Thr⁷⁷、Tyr⁷⁸の対立遺伝子とGlu⁷⁴、Arg⁷⁷、Val⁷⁸の対立遺伝子をヘテロで有する個体は、未発症健康牛に有意に多かった。以上の結果から、Glu⁷⁴、Arg⁷⁷、Val⁷⁸である対立遺伝子、その中でもLys/Arg⁷¹、Glu⁷⁴、Arg⁷⁷、Val⁷⁸の対立遺伝子を有する個体がBLVによる白血病発症に対して抵抗性であると結論された。

【0041】

【表3】

	BLV-infected cattle with						P values	
	healthy (n=43)		PL(n=15)		lymphoma(n=23)		(vs.healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
RV/RV or non-RV	22	51.2	1	6.7	2	8.7	0.0019	0.0005
TV/TV or non-TV	6	14.0	1	6.7	3	13.0	0.4113	0.6173
TY/TY or non-TY	39	90.7	15	100.0	23	100.0	0.2909	0.1712
ERV/ERV or Non-ERV	22	51.2	2	13.3	2	8.7	0.0098	0.0005
ERV/Non-ERV	19	44.2	2	13.3	2	8.7	0.0298	0.0025
ETV/ETV or Non-ETV	6	14.0	0	0	3	13.0	0.1506	0.6173
ATY/ATY or Non-ATY	28	65.1	14	93.3	21	91.3	0.0317	0.0178
ATY/Non-ATY	22	51.2	10	66.7	5	21.7	0.2314	0.0186
NTY/NTY or Non-NTY	12	27.9	3	20.0	2	8.7	0.4083	0.0620
YTY/YTY or Non-YTY	8	18.6	5	33.3	2	8.7	0.9343	0.2445
STY/STY or Non-STY	0	0	1	6.7	0	0	0.2586	-
ERV/ERV	3	7.0	0	0	0	0	0.4000	0.4987
ERV/ATY	10	23.3	2	13.3	1	4.3	0.3397	0.0464
ERV/NTY	5	11.6	0	0	1	4.3	0.2101	0.3108
ERV/YTY	3	7.0	0	0	0	0	0.4000	0.2697
ERV/ETV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
ETV/ATY	3	7.0	0	0	3	13.0	0.4000	0.3456
ETV/NTY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
ATY/ATY	6	14.0	5	33.3	16	69.6	0.9750	8.8E-06
ATY/NTY	4	9.3	2	13.3	0	0	0.8275	0.1712
ATY/YTY	5	11.6	4	26.7	1	4.3	0.9588	0.3108
ATY/STY	0	0	1	6.7	0	0	0.2586	-
NTY/NTY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
NTY/YTY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.2586	0.3485
KERV/KERV or non-KERV	10	23.3	0	0	0	0	0.0367	0.0091
KERV/Non-KERV	9	20.9	0	0	0	0	0.0530	0.0152
RERV/RERV or Non-RERV	13	30.2	1	6.7	2	8.7	0.0618	0.0418
RERV/Non-RERV	12	27.9	1	6.7	2	8.7	0.0845	0.0620
RETV/RETV or Non-RETV	6	14.0	1	6.7	3	13.0	0.4113	0.6173
KATY/KATY or Non-KATY	13	30.2	11	73.3	14	60.9	0.0045	0.0159
KATY/Non-KATY	13	30.2	8	53.3	12	52.2	0.0994	0.0694
AATY/AATY or Non-AATY	19	44.2	5	33.3	14	60.9	0.3366	0.1507
AATY/Non-AATY	18	41.9	5	33.3	10	43.5	0.3959	0.6521
KNTY/KNTY or Non-KNTY	12	27.9	3	20.0	1	4.3	0.4083	0.0190
EYTY/EYTY or Non-EYTY	7	16.3	5	33.3	2	8.7	0.9579	0.3256

【0042】

【表4】

	BLV-infected cattle with						P values	
	healthy (n=43)		PL(n=15)		lymphoma(n=23)		(vs. healthy)	
	n	%	n	%	n	%	PL	lymphoma
KERV/KERV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
KERV/RERV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
KERV/AATY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
KERV/KNTY	3	7.0	0	0	0	0	0.4000	0.2697
KERV/EYTY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
KERV/KATY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RERV/RERV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RERV/RETV	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RERV/KATY	4	9.3	1	6.7	0	0	0.6141	0.1712
RERV/AATY	3	7.0	0	0	1	4.3	0.4000	0.5651
RERV/KNTY	2	4.7	0	0	1	4.3	0.5463	0.7236
RERV/EYTY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
RETV/KATY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.2586	0.3485
RETV/AATY	3	7.0	0	0	2	8.7	0.4000	0.7747
RETV/KNTY	2	4.7	0	0	0	0	0.5463	0.4210
KATY/KATY	0	0	3	20.0	2	8.7	0.0147	0.1179
KATY/RATY	1	2.3	0	0	3	13.0	0.7414	0.1179
KATY/AATY	4	9.3	2	13.3	7	30.4	0.8275	0.0345
KATY/KNTY	1	2.3	1	6.7	0	0	0.4537	0.6515
KATY/EYTY	2	4.7	3	20.0	1	4.3	0.1031	0.7236
AATY/AATY	1	2.3	0	0	4	17.4	0.7414	0.0464
AATY/KNTY	3	7.0	1	6.7	0	0	0.7272	0.2697
AATY/EYTY	3	7.0	1	6.7	0	0	0.7272	0.2697
AATY/ESTY	0	0	1	6.7	0	0	0.2586	-
KNTY/KNTY	1	2.3	0	0	0	0	0.7414	0.6515
KNTY/EYTY	0	0	1	6.7	1	4.3	0.2586	0.3485

【0043】(2)PCR-RFLP法

黒毛和種牛281頭のMHC ClassII DRβ鎖のβ1ドメインの塩基配列を決定したところ、71番目から80番目のアミノ酸配列（塩基配列では211から240）が9種類得られた（図2A）。このなかで、白血病発症に抵抗性を示すK⁷¹E⁷⁴R⁷⁷V⁷⁸及びR⁷¹E⁷⁴R⁷⁷V⁷⁸を有する対立遺伝子をSRB3及

びDRB40プライマー又はSRB3及びDRB100プライマーを用いてPCR増幅し、その産物をPstI及びDraIIIで処理したところ、両制限酵素による消化産物は得られず、アガロースゲル上で一本のバンドとして検出された（図2B）。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> A method for judging a resistance to the onset of bovine leukemia

<130> A01095M

<160> 19

<210> 1

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct gcagatc 38

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct ggagtattct aa 42

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct ggagtatta 39

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct ggagtattg 39

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

tgtaaaacga cggccagtca catttcctgg agtatg 36

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

tgtaaaacga cggccagtgc acatttcctg gatatc 37

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

tgtaaaacga cggccagtag cacatttcct ggagtata 38

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

tgtaaaacga cggccagtca catttcctgg agtattctac 40

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

caggaaacag ctatgacccg ccgctgcaca gtgaaactc 39

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ggaattcctc tctctgcagc acatttcc 28

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11
 tttaaattcg cgctcacctc gccgct 26
 <210> 12
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 12
 tgtaaaacga cggccagtat tcctctctct gcagcacatt tcttg 45
 <210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 13
 tgtaaaacga cggccagt 18
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 14
 caggaaacag ctatgacc 18
 <210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 15
 ggaattcctc tcctctgcagc acatttcct 29
 <210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 16
 aagtcgaccg ctgcacagtg aaactc 26
 <210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 17
 gagtgtcatt tcttcaacgg gac 23
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 18
 ggagaagagt tcgtgcgctt cga 23
 <210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 19
 tgtaaaacga cggccagtct ctctctgcag cacatttcct

【図面の簡単な説明】

【図1】 各病態を示すBLV感染牛（黒毛和種牛）のMHC ClassII DR β 鎖の β 1ドメインの塩基配列を決定し、予測されるアミノ酸配列を比較した結果を示した図である。図中、上段の数字はアミノ酸残基の番号を示し、左側の数字は対立遺伝子の識別番号である。アミノ酸残基は一文字表記で記載した。

【図2】 黒毛和種牛281頭から得られたMHC ClassII D R β 鎖の β 1ドメインの71番目から80番目の9種類のアミノ酸配列、及びそのアミノ酸配列をコードする塩基配列を制限酵素（PstI及びDraII）で消化した結果を示した図である。図中、(A)は決定された塩基配列とその予測されるアミノ酸配列を示し、(B)は制限酵素処理の結果を示す。

【図1】

Healthy	n=86	%	9	11	12	13	24	26	28	30	31	32	37	45	47	55	56	57	59	60	61	65	66	67	70	71	74	77	78	81	85	86							
0101	4	4.7	B	S	K	S	V	F	L	D	Y	Y	T	I	G	F	R	Q	D	E	Y	W	D	P	E	K	E	R	V	H	G	M							
1401	7	8.1	Q	H	-	G	-	L	-	-	H	F	Y	F	D	-	-	P	A	-	Q	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	V						
0701	7	8.1	-	C	-	R	-	-	-	-	C	F	H	F	-	-	-	R	V	-	Q	-	-	-	-	k	-	-	-	-	-	-	V						
0902	5	5.8	-	-	-	-	-	-	-	E	S	F	Y	N	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	E	I	-	-	-	-	-	-	V						
2703	2	2.3	-	Y	N	-	-	-	D	C	-	T	-	G	P	R	P	D	E	Y	W	K	-	-	-	k	-	-	-	-	-	-	-	V					
1101	6	7.0	Q	H	-	G	-	L	-	-	H	F	Y	Y	D	-	-	P	S	-	-	-	-	-	-	R	k	-	T	-	-	-	-	V					
0501	1	1.2	-	H	-	-	L	Y	-	-	-	F	Y	Y	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	E	I	R	-	N	T	Y	-	-	V					
0502	1	1.2	-	H	-	-	L	Y	D	Y	F	-	V	G	Y	R	P	D	K	Y	W	K	-	-	L	R	-	N	T	Y	-	-	-	-	V				
0503	3	3.5	-	-	-	-	L	Y	-	-	-	-	F	Y	Y	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	E	I	R	-	N	T	Y	-	-	-	V				
1302	7	8.1	-	L	-	-	-	-	-	E	S	F	Y	N	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	-	L	R	-	N	T	Y	-	-	-	V				
3401	1	1.2	-	C	-	-	-	-	-	B	S	F	Y	F	-	Y	-	R	V	-	Q	L	-	-	L	Q	-	N	T	Y	-	-	-	-	V				
1601	13	15.1	-	T	-	K	-	-	-	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V				
20012	1	1.2	-	C	-	R	-	L	-	-	-	P	Y	R	-	-	-	P	S	-	-	-	-	-	-	Q	R	A	T	Y	-	-	-	-	V				
0201	4	4.7	-	-	T	-	-	-	-	-	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	E	I	R	A	A	T	Y	-	-	-	V				
1001	10	11.6	-	-	-	-	-	-	-	-	F	H	Y	-	Y	Q	R	V	-	-	C	-	-	-	-	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	V				
1201	6	7.0	-	T	-	K	-	-	-	N	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	-	B	I	R	A	A	T	Y	-	-	-	V			
1501	8	9.3	-	-	T	-	-	-	Y	-	-	-	F	H	F	-	Y	-	R	V	-	Q	L	-	T	R	B	Y	T	Y	-	-	-	-	-	V			
PI.	n=30																																						
0701	1	3.3	-	C	-	R	-	-	-	-	C	F	H	F	-	-	-	R	V	-	Q	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	V			
1101	1	3.3	Q	H	-	G	-	L	-	-	H	F	Y	Y	D	-	-	P	S	-	-	-	-	-	-	R	R	-	T	-	-	-	-	-	-	V			
0503	1	3.3	-	-	-	-	L	Y	-	-	-	-	F	Y	Y	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	E	I	R	-	N	T	Y	-	-	-	-	V		
1302	1	3.3	-	L	-	-	-	-	-	-	B	S	F	Y	N	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	L	R	-	N	T	Y	-	-	-	-	-	V		
GH2ap6	1	3.3	-	-	-	-	L	Y	D	Y	F	-	Y	G	Y	R	P	D	K	Y	W	K	E	I	R	-	N	T	Y	-	-	-	-	-	-	-	V		
1601	14	46.7	-	T	-	K	-	-	-	-	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V		
0201	1	3.3	-	-	T	-	-	-	-	-	-	F	H	F	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	E	I	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	V	
1001	3	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	H	Y	-	Y	Q	R	V	-	-	C	-	-	-	-	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	-	V		
1201	1	3.3	-	T	-	K	-	-	-	N	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	E	I	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	V	
1501	5	16.7	-	-	T	-	-	-	Y	-	-	-	F	H	F	-	Y	-	R	V	-	Q	L	-	T	R	B	Y	T	Y	-	-	-	-	-	-	V		
0801	1	3.3	-	A	T	-	-	-	-	D	Y	F	H	L	G	F	R	P	S	V	H	L	K	-	-	D	B	S	T	Y	-	-	-	-	-	-	-	V	
Lymphoma	n=46																																						
0902	2	4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	B	S	F	Y	N	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	E	I	-	R	-	-	-	-	-	-	-	V		
1101	3	6.5	Q	H	-	G	-	L	-	-	H	F	Y	Y	D	-	-	P	S	-	-	-	-	-	-	R	R	-	T	-	-	-	-	-	-	-	V		
0501	1	2.2	-	H	-	-	L	Y	-	-	-	-	F	Y	Y	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	-	E	I	R	-	N	T	Y	-	-	-	-	V	
3401	1	2.2	-	C	-	-	-	-	-	-	B	S	F	Y	F	-	Y	-	R	V	-	Q	L	-	-	L	Q	-	N	T	Y	-	-	-	-	-	-	V	
1601	16	34.8	-	T	-	K	-	-	-	-	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	
20012	3	6.5	-	C	-	R	-	L	-	-	-	-	F	Y	R	-	-	-	P	S	-	-	-	-	-	-	Q	R	A	T	Y	-	-	-	-	-	-	V	
0201	5	10.9	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	E	I	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	V
1001	11	23.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	H	Y	-	Y	Q	R	V	-	-	C	-	-	-	-	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	-	V	
1201	1	2.2	-	T	-	K	-	-	-	N	-	-	P	H	F	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	E	I	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	V
m64ap3	1	2.2	-	Y	-	-	-	-	-	D	Y	-	T	-	G	F	R	Q	D	B	Q	W	K	-	-	-	-	R	A	A	T	Y	-	-	-	-	-	-	V
1501	2	4.3	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	P	H	F	-	Y	-	R	V	-	Q	L	-	T	R	B	Y	T	Y	-	-	-	-	-	-	-	V

【図2】

A)

Amino acid sequence (position 71-80)										Nucleotide sequence (position 231-240)										Digestion with	
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	Pst I	Dra III
K	R	A	A	V	D	R	V	C	R	A	A	G	C	G	G	C	C	G	A	-	-
R	K	A	A	V	D	R	V	C	R	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	R	A	A	V	D	R	V	C	R	-	A	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-
K	R	A	A	V	D	R	V	C	R	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	+	-
A	R	A	A	V	D	R	V	C	R	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B	R	A	A	V	D	R	V	C	R	G	-	-	T	-	-	-	-	-	-	+	-
B	R	A	A	V	D	R	V	C	R	G	-	-	-	T	-	-	-	-	-	+	-
K	R	A	A	V	D	R	V	C	R	-	-	-	A	-	T	-	-	-	-	+	-
R	K	A	A	V	D	R	V	C	R	-	G	-	-	-	C	-	-	-	-	+	-
R	K	A	A	V	D	R	V	C	R	-	G	-	-	-	-	C	-	-	-	-	+
K	R	A	A	V	D	R	V	C	R	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	+

B)

Restriction enzyme for digesting	Primer for PCR	Digested fragment length (bp)						
		TY	TV	RV	TY/TY	TY/TV	RV/TY	RV/RV
<i>Pst</i> I	DRB40	199, 48	247	247	199, 48	247, 199, 48	247, 199, 48	247
	DRB100	139, 48	187	187	139, 48	187, 139, 48	187, 139, 48	187
<i>Dra</i> III	DRB40	247	194, 53	247	247	247, 194, 53	247	247
	DRB100	187	134, 53	187	187	187, 134, 53	187	187

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA10 AA11 CA03 CA20 HA09
 HA11 HA19 HA20
 4B063 QA01 QA05 QA13 QA19 QQ08
 QQ43 QQ80 QQ96 QR14 QR32
 QR62 QS16 QS25 QS36
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA86 EA50
 EA53 HA05

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.